

## ТЕМПЕРАТУРНАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА В МЕМБРАННЫХ ПРЕПАРАТАХ ФОТОСИСТЕМЫ II БЕЗ КАЛЬЦИЯ В КИСЛОРОДВЫДЕЛЯЮЩЕМ КОМПЛЕКСЕ

© 2021 г. Е.Р. Ловягина, Б.К. Сёмин

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1/12*

*E-mail: [semin@biophys.msu.ru](mailto:semin@biophys.msu.ru)*

Поступила в редакцию 25.11.2019 г.

После доработки 12.10.2020 г.

Принята к публикации 20.10.2020 г.

Исследована температурная устойчивость электронного транспорта к искусственному акцептору электронов 2,6-дихлорофенолиндофенолу в препаратах нативной фотосистемы II и фотосистемы II без катиона кальция в кислородвыделяющем комплексе. Температурная стабильность процессов выделения кислорода и переноса электрона от кислородвыделяющего комплекса к 2,6-дихлорофенолиндофенолу в фотосистеме II значительно отличаются — восстановление 2,6-дихлорофенолиндофенола более устойчиво к действию температуры, чем выделение кислорода. Реакция восстановления 2,6-дихлорофенолиндофенола в препаратах фотосистемы II без кальция менее устойчива к нагреванию, чем в препаратах нативной фотосистемы II. Температурная инактивация мембранных препаратов фотосистемы II без кальция ингибируется цитохромом *c* при концентрации 50 молекул цитохрома *c* на реакционный центр фотосистемы II. Активность препарата (скорость восстановления 2,6-дихлорофенолиндофенола) при этом максимально возрастает на 19%, приближаясь к активности нативной фотосистемы II. Протекторная функция цитохрома *c*, по-видимому, определяется его белковой природой, а не его редокс-функцией, так как равный по величине защитный эффект наблюдался и при добавлении альбумина в аналогичной концентрации. Практически полная инактивация реакции восстановления 2,6-дихлорофенолиндофенола в препаратах фотосистемы II с кальцием и без кальция в кислородвыделяющем комплексе имеет место при одинаковой температуре (50°C). Согласно данным ЭПР после инкубации при этой температуре в препарате фотосистемы II без кальция отсутствует марганцевый кластер, но присутствует периферический белок 33 кДа.

*Ключевые слова: фотосистема 2, кислородвыделяющий комплекс, кальций, термоустойчивость.*

DOI: 10.31857/S0006302921010087

Расшифровка механизма влияния повышенных температур на функционирование фотосинтетического аппарата растений имеет не только теоретическое значение, но и значительный практический интерес. В этой связи данная проблема интенсивно исследуется, и в настоящее время достигнуты определенные успехи в этом направлении (см. обзорную работу [1]). В результате многочисленных исследований установлено, что при повышенных температурах в первую очередь происходит инактивация фотосистемы II (ФС II) фотосинтетического аппарата в результа-

те ингибирования самого чувствительного к теплу компонента ФС II — кислородвыделяющего комплекса (КВК). Термоингибирование КВК сопровождается диссоциацией периферических белков и высвобождением катионов марганца из связывающих участков [2–6]. Полная инактивация выделения кислорода наблюдается при температурах 49–50°C [2, 4, 7]. Первоначальной стадией данного процесса является, по-видимому, диссоциация периферического белка 18 кДа, сопровождающаяся высвобождением катиона кальция из КВК [6]. Затем диссоциируют периферический белок 23 кДа и марганцстабилизирующий белок 33 кДа [4], после чего попарно (2 + 2) высвобождаются катионы марганца [8]. Предполагается, что нагревание инициирует генерацию синглетного кислорода  $^1\text{O}_2$  и гидроксильного радикала  $\text{HO}^\bullet$ , которые разрушают D1-белок реакционного центра фотосистемы II и та-

*Сокращения:* ФС II — фотосистема II, КВК — кислородвыделяющий комплекс, ДХФИФ — 2,6-дихлорофенолиндофенол, ФСII(-Ca) — фотосистема II без катиона кальция в кислородвыделяющем комплексе, ФСII(-Mn) — фотосистема II без марганцевого кластера в кислородвыделяющем комплексе, ЭПР — электронный парамагнитный резонанс.

ким образом индуцируют диссоциацию периферических белков PsbO, PsbP и PsbQ, так же как и катионов марганца, что и приводит к ингибированию функциональной активности ФС II [9].

В исследованиях, посвященных данной проблеме, основным измеряемым параметром, отражающим эффективность термоингибирования ФС II, является скорость выделения кислорода КВК в процессе окисления им воды. В нативной ФС II эти реакции (окисление воды и выделение молекулярного кислорода) сопряжены, т.е. осуществляются взаимосвязанно. Однако при некоторых обстоятельствах молекулы воды могут окисляться не до  $O_2$ , а до промежуточного продукта  $H_2O_2$  без выделения кислорода. Такой процесс происходит в результате эффекта «разобщения» и имеет место в мембранах ФС II после удаления катиона  $Ca^{2+}$  совместно с периферическими белками PsbP (23 кДа) и PsbQ (18 кДа) из КВК [10]. Выделение кислорода в таких препаратах отсутствует, тогда как светоиндуцируемый электронный транспорт, регистрируемый по восстановлению искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорофенолиндофенола (ДХФИФ), сохраняется на достаточно высоком уровне (около 70% от исходной величины) [10]. Этот эффект дает возможность в контексте вышеизложенного исследовать особенности термоингибирования реакции окисления воды, не связанной с процессом выделения кислорода. В данной работе мы провели сравнительное исследование зависимости ингибирования восстановления ДХФИФ, а не выделения  $O_2$ , от температуры инкубации мембранных препаратов интактной ФС II и ФСII(-Ca).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выделение мембранных препаратов ФС II из листьев шпината.** Мембранные препараты ФС II (ВВУ-частицы) были выделены из листьев рыночного шпината согласно методике, опубликованной в работе [11]. Препараты хранили при температуре  $-80^\circ C$  в буфере А следующего состава: 400 мМ сахарозы, 15 мМ NaCl, 50 мМ 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты/NaOH (pH 6.5). Концентрацию хлорофилла определяли в 80%-м растворе ацетона согласно методу, предложенному в работе [12].

**Экстракция катионов  $Ca^{2+}$  из препаратов ФС II.**  $Ca^{2+}$ , PsbQ- и PsbP-белки КВК были удалены из нативных препаратов ФС II путем обработки их буфером, содержащим 2 М NaCl, 0.4 М сахарозы и 25 мМ 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты/NaOH (pH 6.5) [13]. Мембраны ФС II инкубировали в этом буфере при концентрации хло-

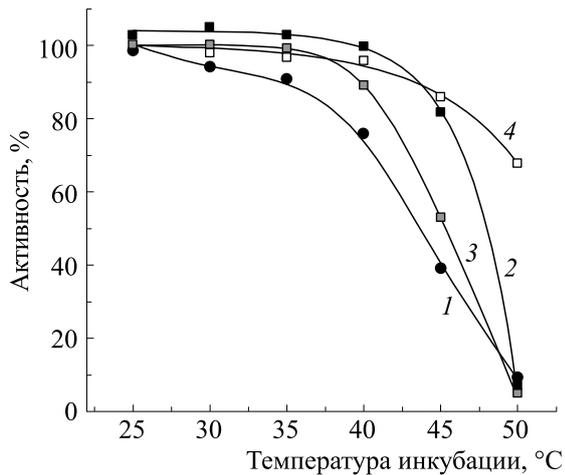
рофилла 0.5 мг/мл в течение 15 мин при комнатном освещении ( $4-5 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) и температуре  $22^\circ C$ . Полученные препараты ФСII(-Ca) дважды отмывали буфером А и ресуспендировали в буфере А (pH 6.5).

**Экстракция катионов марганца из препаратов ФС II.** Экстракцию Mn из ФС II осуществляли путем обработки нативных препаратов при концентрации хлорофилла 0.5 мг/мл 0.8 М трис-HCl-буфером (pH 8.5) (время инкубации 15 мин при комнатных температуре и освещении). Полученные препараты ФС II без марганцевого кластера в кислородвыделяющем комплексе (ФСII(-Mn)) осаждали и трижды отмывали буфером А для удаления неспецифически связанных ионов Mn(II), а затем ресуспендировали в буфере А (pH 6.5). Такие мембранные препараты не содержат всех внешних белков КВК, включая Mn-стабилизирующий белок PsbO, а также катион  $Ca^{2+}$  и марганцевый каталитический кластер.

**Измерение электрон-транспортной активности препаратов ФС II.** Скорость восстановления ДХФИФ определяли спектрофотометрически при длине волны 600 нм за первые 30 с освещения препаратов насыщающим светом. Для расчетов использовали коэффициент молярной экстинкции депротонированной формы ДХФИФ, равный  $21.8 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [14]. Кинетику фотоиндуцированного выделения кислорода препаратами ФС II регистрировали с помощью закрытого электрода Кларка в термостатируемой ячейке при  $25^\circ C$ . В качестве искусственного акцептора электронов использовали 2,6-дихлор-*n*-бензохинон в концентрации 200 мкМ. Источником возбуждающего света при регистрации кинетик восстановления ДХФИФ и выделения кислорода служили светодиоды XBDR0Y (Cree Inc., США) с максимумом излучения при 450 нм.

**Термоинактивация препаратов.** Все препараты ФС II с концентрацией хлорофилла 20 мкг/мл инкубировали при определенной температуре в течение 15 мин (время термообработки, при котором инактивирующий эффект выходит на плато) в темноте, помещая образцы в предварительно прогретый буфер. Затем быстро охлаждали до  $4^\circ C$  во льду (3 мин). Все измерения проводили при температуре  $25^\circ C$ .

**Регистрация спектров электронного парамагнитного резонанса.** Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) был использован для определения светозависимого окисления экзогенных катионов Mn(II) препаратами ФСII(-Ca) путем регистрации шестилинейчатого спектра свободных катионов Mn(II). ЭПР-измерения проводили на радиоспектрометре РЭ1307 трехсантиметрового диапазона (СКБ средств автоматики, Смоленск). Условия регистрации: мощ-



**Рис. 1.** Зависимости скорости выделения  $O_2$  и восстановления ДХФИФ различными препаратами ФС II от температуры предварительной инкубации: 1, 2 – скорости выделения  $O_2$  и восстановления ДХФИФ нативными препаратами ФС II соответственно; 3 – скорость восстановления ДХФИФ препаратом ФСII(-Ca); 4 – скорость восстановления ДХФИФ препаратом ФСII(-Mn) с донорной системой [2 мкМ Mn + 3 мМ  $H_2O_2$ ]. 100% соответствует активности конкретного препарата после инкубации при температуре 25°C: 160 мкмоль ДХФИФ · мг Хл<sup>-1</sup> · ч<sup>-1</sup> и 480 мкмоль  $O_2$  · мг Хл<sup>-1</sup> · ч<sup>-1</sup> для нативной ФС II; 110 мкмоль ДХФИФ · мг Хл<sup>-1</sup> · ч<sup>-1</sup> – для препарата ФСII(-Ca); 170 мкмоль ДХФИФ · мг Хл<sup>-1</sup> · ч<sup>-1</sup> – для препарата ФСII(-Mn). Условия термоинактивации описаны в разделе «Материалы и методы».

ность СВЧ – 20 мВт, амплитуда ВЧ-модуляции – 10 Гс, константа времени – 10 мс, время развертки – 20 с, ширина развертки – 1000 Гс. Образцы помещали в плоскую кварцевую кювету с внутренним зазором 0.25 мм. Освещение проводили в резонаторе радиоспектрометра сфокусированным светом интенсивностью 1500 мкЭ · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup>. Концентрация хлорофилла составляла 1 мг/мл. Все эксперименты были выполнены при 22°C.

Представленные на рисунках и в таблице данные являются средними арифметическими значениями, полученными в независимых экспериментах при проведении не менее трех измерений в каждом опыте.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

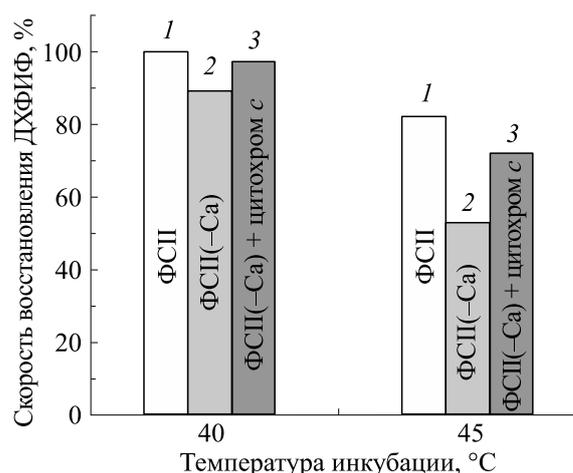
В процессе измерения температурной устойчивости препараты были инкубированы при заданной температуре в интервале 25–50°C в течение 15 мин, а затем деструктивное действие тепла быстро останавливали, охлаждая препараты во льду. Измерения активности препаратов (восстановление ДХФИФ или выделение кислорода) проводили при температуре 25°C. На рис. 1 пока-

заны зависимости устойчивости реакции выделения кислорода интактным препаратом ФС II (кривая 1) и реакции восстановления ДХФИФ препаратами ФС II, ФСII(-Ca) и препаратом ФС II без катионов марганца в КВК (ФСII(-Mn)). В последнем случае в качестве донора электронов использовали систему  $H_2O_2$  (3 мМ) + Mn(II) (2 мкМ). Полученные результаты показывают, что процесс восстановления ДХФИФ в нативных препаратах ФС II более устойчив к повышенной температуре, чем реакция выделения  $O_2$ . Процесс инактивации выделения  $O_2$  начинается при более низких температурах (30–35°C), чем ингибирование восстановления ДХФИФ (рис. 1). Этот факт может быть объяснен ранней диссоциацией периферического белка 18 кДа (PsbQ) и ингибированием вследствие этого реакции выделения кислорода [6]. В то же время в результате эффекта разобщения [10] реакция окисления воды ингибируется незначительно, что проявляется в большой скорости восстановления ДХФИФ. Сочетание этих двух механизмов и является причиной различия в температурной устойчивости выделения  $O_2$  и восстановления ДХФИФ. Реакция восстановления ДХФИФ в мембранных препаратах ФСII(-Ca) менее устойчива к нагреванию (рис. 1, кривая 3), чем в нативных препаратах ФС II, но более устойчива, чем процесс выделения кислорода нативными мембранами ФС II. Поскольку препарат ФСII(-Ca) не содержит периферических белков PsbP и PsbQ, скорость окисления им воды меньше, чем в нативных препаратах, и определяется только присутствием марганцевого кластера и одного периферического (Mn-стабилизирующего) белка PsbO, что делает эту реакцию более чувствительной к температуре. Зависимость 4 на рис. 1 демонстрирует устойчивость к температуре препарата ФС II без КВК (ФСII(-Mn)), т.е. зависимость электрон-транспортной цепи от  $Y_Z$  до  $Q_B$ . Полученный результат показывает, что наиболее чувствительным к температуре в ФС II является марганцевый кластер в комплексе с периферическими белками.

В последующих экспериментах мы исследовали возможность увеличения устойчивости к повышенной температуре ФС II без двух периферических белков и кальция в КВК путем добавления экзогенного белка, в качестве которого был выбран цитохром *c*. Это обусловлено тем, что в ФС II термофильных цианобактерий в качестве периферического белка присутствует цитохром  $c_{550}$ , стабилизирующий КВК при термоинактивации [15]. Цитохром *c*, добавленный к препарату ФСII(-Ca) в соотношении 50 молекул на реакционный центр, существенно увеличивает устойчивость мембранного препарата к нагреванию (рис. 2, таблица). Следует отметить, что цитохром *c* может быть восстановлен электрон-транспорт-

ными компонентами ФС II [16, 17], т.е. окислять их, влияя тем самым на структурные особенности препарата. Однако редокс-активность цитохрома *c*, по-видимому, не является основной в обнаруженной нами защитной функции, так как другой белок (без редокс-активности) – альбумин – также повышает устойчивость ФСII(-Ca) к термоинактивации (см. таблицу).

Интересно отметить, что полная инактивация процесса переноса электрона от КВК к ДХФИФ происходит при одинаковой температуре (50°C) как в нативном препарате ФС II, так и в препарате ФСII(-Ca). Прекращение электронного потока к экзогенному акцептору электронов означает полное ингибирование процесса окисления воды скорее всего в результате полной деструкции марганцевого кластера. Мы исследовали препарат ФСII(-Ca), прогретый при температуре 50°C (рис. 3). В растворе катионы Mn(II) имеют шестилинейчатый спектр ЭПР, который надежно регистрируется при диссоциации восстановленного марганцевого кластера [18–20]. Измеренный ЭПР-спектр прогретого препарата показывает наличие в растворе свободных катионов восстановленного марганца, которые исчезают при освещении. Исчезновение шестилинейчатого спектра свидетельствует об окислении катионов Mn(II) препаратом ФСII(-Ca), которое может происходить только на высокоаффинном Mn-связывающем участке [21]. Эти результаты свидетельствуют, что прогревание фотосистемы при температуре, близкой к 50°C, сопровождается восстановлением катионов марганца каталитического центра, их выходом из участков связывания и появлением свободного высокоаффинного

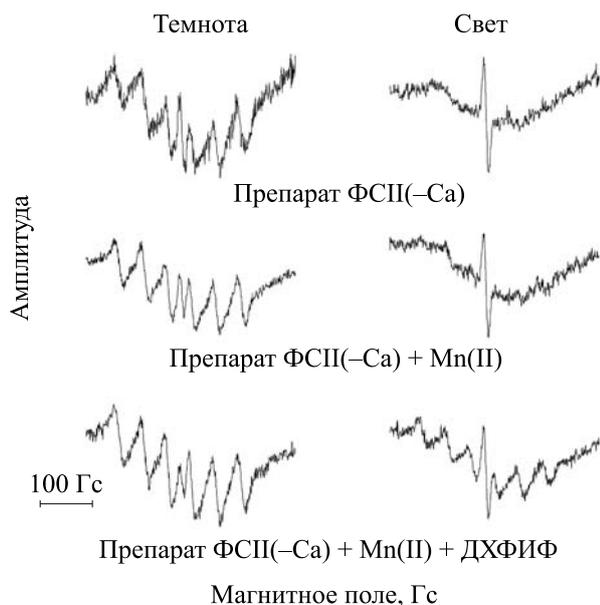


**Рис. 2.** Влияние цитохрома *c* на термоустойчивость электронного транспорта (восстановление ДХФИФ) в препаратах ФСII(-Ca), прогретых при 40 или 45°C. За 100% принята величина скорости восстановления акцептора каждым конкретным препаратом, измеренная после прогревания при температуре 25°C. Препараты инкубировали в буфере А (рН 6.5) при заданной температуре в течение 15 мин, затем быстро охлаждали до 4°C (3 мин), центрифугировали 5 мин при 16000 *g* и суспендировали в буфере А. Измерения проводили при температуре 25°C. Концентрация цитохрома *c* составляла 5 мкМ.

участка. Увеличение концентрации катионов марганца в растворе при добавлении экзогенного марганца не влияет на эффективность их окисления при освещении, что демонстрирует высокую концентрацию окисляющих центров. Следует отметить, что окисленные на свету катионы мар-

Влияние цитохрома *c* и альбумина на термоустойчивость электронного транспорта в препаратах ФСII(-Ca)

Препарат	Температура инкубации 25°C		Температура инкубации 45°C	
	Скорость восстановления ДХФИФ			
	мкмоль · мг Хл <sup>-1</sup> · ч <sup>-1</sup>	%	мкмоль · мг Хл <sup>-1</sup> · ч <sup>-1</sup>	%
ФС II	160	100	131	82
ФСII(-Ca)	109	68	58	36
ФСII(-Ca) + 5 мкМ цитохрома <i>c</i> (измерение активности в присутствии цит. <i>c</i> )	108	68	82	51
ФСII(-Ca) + 5 мкМ цитохрома <i>c</i> (цитохром <i>c</i> удален после прогревания)	106	66	80	50
ФСII(-Ca) + 5 мкМ альбумина (измерение активности в присутствии альбумина)	109	68	84	53
ФСII(-Ca) + 5 мкМ альбумина (альбумин удален после прогревания)	107	67	83	52



**Рис. 3.** Спектры ЭПР препаратов ФСII(-Ca), прогретых при 50°C в течение 15 мин. Термоинкубацию препаратов проводили при концентрации хлорофилла 20 мкг/мл в темноте, затем препарат быстро охлаждали до 4°C и концентрировали с помощью центрифугирования 5 мин при 16000 g. Концентрация мембран в образце составляла 1 мг Хл/мл (4 мкМ реакционных центров), экзогенного Mn(II) 4 мкМ, ДХФИФ 40 мкМ. Интенсивность освещения 1500 мкЭ · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup>. Условия измерения ЭПР-спектров приведены в разделе «Материалы и методы».

ганца быстро восстанавливаются в темноте. При освещении препарата в присутствии ДХФИФ восстановленный ДХФИФН<sub>2</sub> частично восстанавливает окисленные катионы марганца, в результате чего на свету появляется шестилинейчатый спектр. Скорость восстановления значительно увеличивается при наличии в фотосистеме белка PsbO [19], поэтому наличие шестилинейчатого спектра в спектре ЭПР образца, освещенного в присутствии ДХФИФ, свидетельствует, что во всяком случае 15-минутная инкубация препарата ФСII(-Ca) при температуре 50°C не сопровождается полной диссоциацией этого белка.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное исследование термоустойчивости реакции окисления воды с выделением кислорода (полярографическая регистрация кинетик синтеза O<sub>2</sub> препаратами ФС II) и неполного окисления воды до перекиси водорода (спектрофотометрическая регистрация скорости восстановления акцептора электронов ДХФИФ препаратами ФС II без катиона Ca<sup>2+</sup> в КВК) показало, что в обоих препаратах полная инактивация этих реакций происходит при одной темпера-

туре (50°C), хотя их температурная зависимость разная: процесс неполного окисления воды более устойчив к нагреванию препарата ФС II. Полученный результат, по-видимому, обусловлен эффектом разобщения [10], т.е. тем, что первоначально происходит инактивации реакции синтеза молекулярного кислорода и лишь затем реакции неполного окисления воды без выделения O<sub>2</sub> частично поврежденным КВК. Полная инактивация препарата ФСII(-Ca), в отличие от нативного препарата ФС II, сопровождается удалением марганцевого кластера при сохранении белка PsbO. Установлено, что водорастворимый белок цитохром *c* повышает термоустойчивость электрон-транспортной цепи в препаратах ФСII(-Ca), не участвуя при этом в окислительно-восстановительных превращениях.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. I. Allakhverdiev, V. D. Kreslavski, V. V. Klimov, et al., *Photosynth. Res.* **98**, 541 (2008).
2. D. Nash, M. Miyao, and N. Murata, *Biochim. Biophys. Acta* **807**, 127 (1985).
3. L. K. Thompson, R. Blaylock, J. M. Sturtevant, et al., *Biochemistry* **28**, 6686 (1989).
4. I. Enami, M. Kitamura, T. Tomo, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1186**, 52 (1994). Isao
5. Y. Yamane, Y. Kashino, H. Koike, et al., *Photosynth. Res.* **57**, 51 (1998).
6. M. Barra, M. Haumann, and H. Dau, *Photosynth. Res.* **84**, 231 (2005).
7. S. Z. Toth, J. T. Puthur, V. Nagy, et al., *Plant Physiol.* **149**, 1568 (2009).
8. P. Pospisil, M. Haumann, J. Dittmer, et al., *Biophys. J.* **84**, 1370 (2003).
9. A. Yamashita, N. Nijo, P. Pospisil, et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 28380 (2008).
10. K. Semin, L. N. Davletshina, I. I. Ivanov, et al., *Photosynth. Res.* **98**, 235 (2008).
11. F. Ghanotakis and G. T. Babcock, *FEBS Lett.* **153**, 231 (1983).
12. R. J. Porra, W. A. Tompson, and P. E. Kriedemann, *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 384 (1989).
13. T. Ono and Y. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 269 (1990).
14. J. M. Armstrong, *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 194 (1964).

15. Y. Nishiyama, H. Hayashi, T. Watanabe, et al., *Plant Physiol.* **105**, 1313(1994).
16. S. A. Khorobrych and B. N. Ivanov, *Photosynth. Res.* **71**, 209 (2002).
17. B. K. Semin, L. N. Davletshina, K. N. Timofeev, et al., *Photosynth. Res.* **117**, 385 (2013).
18. A-F. Miller and G. W. Brudvig, *Biochim. Biophys. Acta* **1056**, 1 (1991).
19. B. K. Semin, T. E. Podkovirina, L. N. Davletshina, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.* **47**, 361 (2015).
20. A. Zavafer, M. H. Cheah, W. Hillier, et al., *Sci. Rep.* **5**, 16363 (2015).
21. T. Ono and H. Mino, *Biochemistry* **38**, 8778 (1999).

## Thermal Stability of Electron Transport in the Oxygen-Evolving Complex of Ca-Depleted Photosystem II Membranes

E.R. Lovyagina and B.K. Semin

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia*

Thermal stability of electron transport to artificial electron acceptor 2,6-dichlorophenolindophenol was investigated in intact photosystem II (PS II) and Ca-depleted photosystem II (PSII(-Ca)) membranes in the oxygen-evolving complex. The thermal stability data of the processes of oxygen evolution and electron transport from the oxygen-evolving complex to 2,6-dichlorophenolindophenol in PS II vary significantly – reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol is more stable than oxygen evolution in the the effects of temperature exposure. Reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol in PSII(-Ca) membranes is less temperature resistant than that in the intact PS II samples. Heat inactivation of PSII(-Ca) membranes is inhibited by cytochrome *c* in the presence of 50 cytochrome *c* molecules per the PS II reaction center. Meanwhile, the sample activity (the rate of 2,6-dichlorophenolindophenol reduction) increased to the maximum by 19% reaching the value close to that of the activity of intact PS II samples. Protective function of cytochrome *c* is apparently determined by its protein nature rather than by its redox function since a similar protective effect was observed after addition of albumin at the same concentration. Almost full inactivation of 2,6-dichlorophenolindophenol reduction in PSII(-Ca) and PS II samples is observed at the same temperature (50°C). According to EPR data, after incubation at this temperature, the manganese cluster is absent in the PSII(-Ca) sample but the extrinsic 33 kDa protein is still present.

*Keywords: photosystem II, oxygen-evolving complex, calcium, temperature stability*